

北高丛越桔芽器官离体培养与快繁体系的建立

赵建萍¹ 柏新富¹ 蒋小满¹ 张 萍¹ Bi Kehua²

(1. 鲁东大学生命科学学院 烟台 264025; 2. Cansino Agricultural Development Ltd. Langley, V2Y2H8, Canada)

关键词: 北高丛越桔; 芽器官; 离体培养; 快繁

中图分类号: S718.46; Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-7488(2007)05-0111-05

Rapid Propagation of Plantlets from Sprout of *Vaccinium corymbosum* in VitroZhao Jianping¹ Bai Xinfu¹ Jiang Xiaoman¹ Zhang Ping¹ Bi Kehua²

(1. School of Life Sciences, Ludong University Yantai 264025;

2. Cansino Agricultural Development Ltd. Langley, V2Y2H8, Canada)

Abstract: The rapid propagation of plantlets of *Vaccinium corymbosum* in vitro was studied by using the stem-segment with buds as the explant. The optimal culture conditions were set as follows: 1) for the initial culture, the explants were sterilized with alcohol, sap nation of cresol and HgCl₂, and then cultured on WPM medium containing ZT 3.0 mg·L⁻¹ and 3% sucrose; 2) the medium for clump bud induction was WPM + ZT 2.0 mg·L⁻¹ + 3% sugar; 3) the medium for robust shoot was WPM + ZT 0~1.0 mg·L⁻¹ + 3% sugar; 4) for adventitious root induction from shoots, the medium was 1/2 WPM liquid nutrients containing IBA 1.0~5.0 mg·L⁻¹ and 2% sugar, in which either vermiculite, filter paper or sterilized cotton were added, and shoots were cultured under a photoperiod of 12 h illumination and 12 h darkness alternatively after 14 days in darkness; 5) the medium for transplanting was turfy-soil and mosses (V:V = 1:1).

Key words: *Vaccinium corymbosum*; sprout; culture in vitro; rapid propagation

越桔为杜鹃花科(Ericaceae)越桔属(*Vaccinium*)灌木类小浆果果树。其果实为蓝色或红色,酸甜适中,具有极高的营养价值和医疗保健作用,特别是抗氧化能力为所有果品蔬菜之首,对防止人体细胞衰老,预防老年性疾病(心脏病、白内障、癌症、记忆力衰退等)具有特殊功效,因而被国际粮农组织列为五大健康食品之一(顾烟等,2001),被美国最有影响的健康杂志《Prevention》誉为“神奇果”(於虹等,2003),是近年来发展最为迅速的集营养、保健于一身的第3代果树新品。北高丛越桔(*Vaccinium corymbosum*)是越桔属中经济价值最高的1个种(顾烟等,2001),因其果实大、品质佳、口感好,深受人们青睐,已成为国际鲜果市场销售的主要品种。近年来鲁东大学生命科学学院将部分优质北高丛越桔引进国内,但常规繁殖方法不能满足快速发展的需要。采用组织培养离体快繁越桔的研究已有报道,但多数研究认为:越桔试管生根较为困难,移栽成活率低(Rowland *et al.*, 1992; Dweikat *et al.*, 1998; 王侠礼等,2003);以叶片、节间为外植体诱导不定芽存在变异问题;而腋芽增殖快繁方法也仍然不够完善(Wojciech *et al.*, 2005)。作者于2000—2005年对从加拿大引进的北高丛越桔优良品种‘晚蓝’、‘蓝丰’带芽茎段的离体培养进行了系统研究,成功地建立了高效快繁体系,可应用于工厂化育苗。

1 材料与方 法

1.1 材料 供试北高丛越桔品种‘晚蓝’(‘Lateblue’)、‘蓝丰’(‘Bluecrop’),由加拿大 Cansino 农业发展有限公司提供,栽培于鲁东大学生命科学学院苗圃中。分别于春(4月22日)、夏(6月30日)、秋(10月14日)3个季节选取长势旺盛的幼嫩枝条,除去所有叶片,切取除顶芽外的第3~10节嫩茎作外植体。

1.2 方法 1)外植体的灭菌 在超净工作台上将外植体置于70%乙醇中1 min,再用0.5%新洁尔灭消毒10 min,后放于0.1% HgCl₂中分别处理5、8、11 min,无菌水冲洗5次,最后将枝条切成长0.5~1.0 cm带腋芽茎段。

2)初代培养 将已灭菌的外植体接种于启动培养基中。启动培养以WPM为基本培养基,添加ZT(0、1.0、3.0、5.0 mg·L⁻¹)。培养30 d后统计外植体的污染率、成活率和出芽率。

培养基中激素单位为 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 均加琼脂 0.6% ~ 0.7%; pH 5.0 ~ 5.2; 在 $1.2\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ 、 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 饱和蒸汽压力下灭菌 20 min; 培养温度白天 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、夜间 (20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$; 光照 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$, 光照强度 $1\ 500\sim 2\ 000\text{ lx}$ 。

3) 丛生芽诱导和增殖 初代培养 60 d, 将新芽切割后转入不同继代培养基中, 每处理接种茎段 30 个, 培养 60 d, 统计月增殖倍数 (每个茎段上丛生芽数/每个茎段上原有腋芽数/培养月数) 以及每个茎段上的有效苗 (高 1.5 cm 以上且生长健壮的小苗) 数, 以筛选适宜于芽增殖的培养条件。

4) 不定根的诱导 将 3 cm 左右长的无根苗接种到各种生根培养基中, 所有生根培养基中均加入 1/2 WPM 培养液和 2% 的食用白糖, 蛭石粒、脱脂棉球、滤纸团等均与培养液一起经 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌。培养 40 d 后统计生根率、平均根长、平均根数。

5) 移栽驯化 将已诱导生根并开瓶炼苗的‘晚蓝’、‘蓝丰’试管苗取出, 移栽至 3 种基质中: 1) 草炭土 + 蛭石 (体积比 1:1); 2) 草炭土 + 苔藓 (体积比 1:1); 3) 草炭土 + 河沙 (体积比 1:1)。浇透 1/2 WPM 营养液, 并保持温度 $18\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 80%。30 d 调查成活率。

2 结果与分析

2.1 无菌材料获得与外植体不定芽的分化 为了获得无菌培养物, 选择灭菌效果好、对试材杀伤力尽可能小的灭菌方法及处理时间尤为重要。同时, 离体材料的分化还取决于培养基中激素的种类和浓度。试验结果 (表 1) 表明: 1) 外植体经 $0.1\% \text{ HgCl}_2$ 浸泡 5 min, 杀菌效果不及 8 min、11 min, 但处理时间达 11 min 时, 部分外植体变褐, 存活率反低于 8 min; 2) 外植体在不加任何激素的 WPM 培养基中, 接种前已抽出的小芽先伸展后自行枯萎、脱落, 不再有新芽萌发。而添加 $\text{ZT } 3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时新芽分化率最高, 达 82%。

表 1 HgCl_2 处理时间和 ZT 对初代培养的影响^①
Tab.1 Effects of HgCl_2 and ZT on initial culture of the explants

HgCl_2 处理时间 HgCl_2 treatment time/min	ZT/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	‘晚蓝’ ‘Lateblue’			‘蓝丰’ ‘Bluecrop’		
		污染率 Contamination rate/%	存活率 Survival rate/%	出芽率 SFF/%	污染率 Contamination rate/%	存活率 Survival rate/%	出芽率 SFF/%
5	0	38.0	50.0	0	26.0	58.0	0
5	1	44.0	54.0	62.9	40.0	60.0	60.0
5	3	30.0	68.0	73.5	36.0	70.0	68.6
5	5	42.0	58.0	51.7	32.0	68.0	55.9
8	0	12.0	82.0	0	8.0	88.0	0
8	1	18.0	84.0	69.1	6.0	92.0	63.0
8	3	6.0	90.0	75.6	0	100.0	82.0
8	5	12.0	88.0	52.3	12.0	88.0	56.8
11	0	2.0	54.0	0	4.0	52.0	0
11	1	0	70.0	37.1	6.0	50.0	32.0
11	3	4.0	66.0	45.5	0	54.0	59.3
11	5	10.0	50.0	36.0	0	62.0	45.2

① 污染率 = 污染外植体数 / 接种外植体数 Contamination rate = number of contaminated explants / number of inoculated explants; 存活率 = 存活外植体数 / 接种外植体数 Survival rate = number of survival explants / number of inoculated explants; 出芽率 = 发生芽的外植体数 / 成活外植体数 SFF (shoot forming frequency) = number of shoot-forming explants / number of survival explants.

试验还显示离体材料的污染率、存活率和出芽率还与取材时期有关。4 月下旬取材污染率低, 存活率高。这可能是因为 4 月份烟台地区气温较低 ($12\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), 材料受杂菌污染较轻, 而植株生长旺盛; 6 月底气温较高, 适合杂菌生长, 外植体污染率高, 存活率降低; 10 月中旬, 植物体已近休眠状态, 此时获取的茎节外植体培养后成芽率低。综合以上试验得出, 在乙醇、新洁尔灭、 HgCl_2 联用条件下, 4 月下旬取材、 HgCl_2 处理 8 min、 $\text{ZT } 3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 是适于北高丛越桔无菌材料获得的最佳条件。

存活的外植体 10 d 后节间开始膨大生长, 30 d 后相继出现 1~3 个新芽 (图版 I - 1~2), 切割后可用于继代培养。

2.2 丛生苗的诱导和增殖 将初代培养分化产生的不定芽切割后接入 MS、1/2MS、MMS、WPM 4 种培养基上, 发现它们都能使不定芽进一步伸长和增殖, 但 WPM、1/2MS、MMS 的表现明显好于 MS, 60 d 的不定芽增殖倍数均高于 6, 而 MS 仅为 3.11, 且在 MS 培养基中 31.5% 的试管苗逐渐出现黄化和褐化现象。将初代培养分化产生的不定芽转入 WPM 分别附加 3 种细胞分裂素的培养基中, 对不定芽诱导及生长的效果 (按优劣) 依次是 $\text{ZT} > 2\text{ip} > \text{BA}$; 在添加 ZT 和 2ip 的培养基中 10 d 左右, 茎段从节部四周开始诱导出多个不定芽并逐

渐形成簇状丛生芽,后直立生长,但 ZT 的增殖系数是 2ip 的 1.7~3 倍。而在添加 BA 的培养基中,茎节一周后开始变粗,由切口处逐渐产生愈伤组织后再分化出芽,不定芽增殖系数低,遗传稳定性差。

ZT 与 NAA 配比的 WPM 对‘晚蓝’和‘蓝丰’茎节培养的结果显示,NAA 浓度不宜大于 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,NAA 浓度提高使茎节愈伤化严重,形成的丛生芽团密集、矮化而抑制了主茎伸长,难以分离出正常小苗。而分别以蔗糖或食用白糖作为芽诱导培养基的碳源,培养结果表明,不同碳源对‘晚蓝’和‘蓝丰’茎节不定芽诱导和健壮生长的作用无显著差异。因此为降低成本完全可以选用食用白糖作为诱导培养基的碳源。

在以上单因子试验基础上,采用优选法对基本培养基、ZT 和 NAA 进行组配,试验结果如表 2 所示,在 WPM + ZT $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下,所试两品种北高丛越桔不定芽月增殖倍数和有效苗数均达到最高,增加 NAA 且随 NAA 浓度的提高,有效苗趋于矮化,有效苗数递减。

2.3 继代与壮苗培养 将诱导所得丛生芽切割成 1 cm 左右茎段,继续转接于 WPM + ZT $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 分化培养基中,可反复诱导丛生芽形成。而分割后小于 1 cm 的簇状小芽,则转入无激素或 ZT 浓度较低 ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 WPM 壮苗培养基中,有利于芽苗更快地伸长和健壮生长。

表 2 不同基本培养基、ZT 和 NAA 对丛生芽诱导的影响
Tab.2 Effects of the basic media, ZT and NAA on inducing clump shoots

培养基 Medium	ZT/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	‘晚蓝’ ‘Lateblue’			‘蓝丰’ ‘Bluecrop’		
			月增殖倍数 Ratio of monthly multiplication	有效苗数 Number of efficiency plantlets	有效苗高 Height of efficiency plantlets/cm	月增殖倍数 Ratio of monthly multiplication	有效苗数 Number of efficiency plantlets	有效苗高 Height of efficiency plantlets/cm
1/2MS	1.0	0	8.1	6.4	4.5	9.0	7.9	3.9
1/2MS	2.0	0.2	7.8	5.9	2.9	10.1	6.5	2.8
1/2MS	4.0	0.4	4.9	3.6	1.8	6.5	4.7	2.0
MMS	1.0	0.2	6.9	5.1	2.8	7.8	5.9	2.5
MMS	2.0	0.4	5.5	4.0	2.0	9.0	5.6	1.9
MMS	4.0	0	7.5	5.5	3.5	10.9	8.3	3.6
WPM	1.0	0.4	4.2	3.6	2.2	6.3	4.8	2.1
WPM	2.0	0	10.6	9.0	4.2	12.8	9.8	3.8
WPM	4.0	0.2	5.8	4.8	2.9	10.2	7.5	2.8

2.4 不定根的诱导 将试管苗新梢转入 1/2WPM 附加不同质量浓度 IBA、NAA 的生根培养基中,40 d 调查结果显示:不添加生长素,试管苗生根率为 0;添加 NAA 浓度大于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中,植株矮小,叶片黄化,基部愈伤化严重,诱导产生的根质地差、移栽时易断;附加 IBA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,生根率不超过 5.6%,而 IBA 浓度增至 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,生根率反呈下降趋势。表明较适于北高丛越桔试管生根的生长素及浓度为:IBA $0.5 \sim 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;在该浓度范围内,‘晚蓝’、‘蓝丰’的生根率也仅有 22.0% 和 57.5%。

以蛭石粒、脱脂棉球、滤纸团、苔藓、琼脂(对照)分别作培养基支持物,进行生根培养试验,结果表明,培

培养基支持物对‘晚蓝’试管苗诱导生根具有重要影响。由表 3 可见,除了用苔藓作培养基支持物与对照无显著差异外,用蛭石粒、脱脂棉球、滤纸团作培养基支持物,‘晚蓝’试管苗生根率超出对照 40%~66%,经卡方独立性检验,对照(琼脂)与滤纸团、蛭石粒、脱脂棉间的 χ^2 值分别为 27.74、25.17 和 16.98,均大于 $\alpha = 0.01$ 时 χ^2 临界值 6.64,说明存在极显著差异;而琼脂与苔藓之间, χ^2 值为 0.04,蛭石粒、滤纸团、脱脂棉相互间 χ^2 值在 0.01~0.18,均小于 $\alpha = 0.05$ 时的临界值 3.84,说明它们之间无显著差异。表 3 结果还显示,试管苗新梢转接到生

表 3 不同支持物和光照条件对‘晚蓝’试管苗生根的影响^①
Tab.3 Effects of different supports and light condition on rooting of tube shoots of ‘Lateblue’

支持物 Support	光照条件 Light conditions	接种数 Number of inoculated shoots	生根株数 Number of rooting plantlets	生根率 Rooting ratio/%
琼脂 Agar	I	20	4	20.0
琼脂 Agar	II	20	3	15.0
蛭石粒 Vermiculite	I	21	16	80.0
蛭石粒 Vermiculite	II	20	15	71.4
滤纸团 Filter paper	I	18	15	83.3
滤纸团 Filter paper	II	18	14	77.8
脱脂棉 Absorbent cotton	I	18	14	77.8
脱脂棉 Absorbent cotton	II	18	10	55.6
苔藓 Moss	I	20	5	25.0
苔藓 Moss	II	24	3	12.5

① I: 先进行 14 d 全黑暗培养,然后于 12 h 间歇光照下培养。12 h light and 12 h dark per period after 14 d dark. II: 始终于间歇光照下培养。12 h light and 12 h dark per period.

根培养基后,先进行 14 d 黑暗培养,然后转到间歇光照下培养,有利于‘晚蓝’试管苗生根。

为了进一步探索生根培养的最佳培养基,以 1/2 WPM 为营养液,在暗培养 14 d 后间歇光照培养下,研究了蛭石粒、脱脂棉球、滤纸团 3 种支持物,0.5、1.0、2.0、5.0 mg·L⁻¹ IBA 浓度和 0.2 mg·L⁻¹ NAA 优化组合对‘晚蓝’和‘蓝丰’试管生根的影响(表 4)。结果表明,蛭石粒、脱脂棉、滤纸团 3 种支持物附加 IBA 1.0 或 5.0 mg·L⁻¹,2 个品种的生根率均高于 83%,其中蛭石支持物 + IBA 1.0 或 5.0 mg·L⁻¹ 的生根效果最好,40 d 时‘晚蓝’、‘蓝丰’试管生根率分别为 96.7% 和 96.6%,且试管苗生长健壮。表明蛭石支持物对北高丛越桔试管苗生根具有促进作用。

表 4 不同培养基支持物和 IBA、NAA 对生根培养的影响
Tab.4 Effects of different supports and IBA, NAA on rooting culture

支持物 Support	IBA/ (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)	‘晚蓝’ ‘Lateblue’			‘蓝丰’ ‘Bluecrop’		
			生根率 Rooting ratio/%	平均根数 Mean number of roots	平均根长 Mean length of roots/cm	生根率 Rooting ratio/%	平均根数 Mean number of roots	平均根长 Mean length of roots/cm
蛭石粒 Vermiculite	0.5	0	64.4	3	1.9	75.0	4	2.5
	1.0	0	71.0	3	2.3	96.6	6	3.1
	2.0	0	80.0	4	2.2	83.3	5	2.7
	5.0	0	96.7	4	3.0	82.0	5	2.7
	0	0.2	40.0	7	0.9	28.6	6	1.2
滤纸团 Filter paper	0.5	0	47.8	3	1.8	72.3	5	2.2
	1.0	0	66.0	4	2.0	90.2	6	2.1
	2.0	0	74.0	4	2.3	76.6	5	2.6
	5.0	0	86.7	5	2.8	78.9	6	2.8
	0	0.2	33.3	5	1.3	50.0	5	1.4
脱脂棉 Absorbent cotton	0.5	0	27.8	3	1.5	66.7	4	2.7
	1.0	0	60.3	3	1.3	85.9	5	3.0
	2.0	0	58.8	4	1.7	75.0	5	2.5
	5.0	0	83.3	4	2.5	70.0	4	2.3
	0	0.2	27.8	5	1.0	22.2	6	0.8

2.5 移栽驯化 完整植株在 3 种基质苗床中 15 d 后有新的不定根发生,老叶生长,新叶出现,表明组培苗已存活。其中以草炭土 + 苔藓(体积比为 1:1)移栽成活率最高,超过 90%(表 5)。成活的试管苗 3~4 个月后株高 20 cm 左右,可移栽于大田中。

3 结论与讨论

木本植物组织培养的困难之一是建立无菌材料(陈正华,1986)。在建立北高丛越桔无菌培养物时,以 4 月份取材,乙醇、新洁尔灭、HgCl₂ 联用,且 HgCl₂ 处理 8 min 时,污染率低,存活率和萌芽率均高。

目前,越桔器官分化中选用的培养基有 WPM、MMS、1/2MS、MS、LS、

Anderson 等,但多数研究认为 WPM 效果最好,高盐浓度的 MS 不利于越桔不定芽分化(Wolfe *et al.*, 1983;刘庆忠等,2001)。本研究结果与 Wolfe 等(1983)的结论相符,在 WPM 培养基中附加 ZT 2.0 mg·L⁻¹,‘晚蓝’和‘蓝丰’茎节不定芽月增殖倍数均超过 10,为工厂化快繁优质越桔种苗提供了保证。

王侠礼等(2003)、Rowland 等(1992)、Dweikat 等(1998)认为:越桔试管生根慢,且生根率低。本文采用常规琼脂培养基对‘晚蓝’、‘蓝丰’试管生根的研究结果也证明了这一点。但发现:改用脱脂棉、滤纸团、蛭石粒作培养基支持物其试管生根率明显升高,特别是在蛭石培养基中 40 d 的生根率达 96%。分析其原因主要是,以蛭石、滤纸团、脱脂棉为支持物配制的生根培养基间隙较大,通透性好,利于养分的运输和交换(刘福生等,2001;赵建萍等,1998)。使用蛭石、滤纸团、脱脂棉配制生根培养基时,须注意营养液要加适量,在加营养

表 5 移栽基质与存活率的关系

Tab.5 The relationship between substrate and survival rate

基质 Substrate	移栽株数 Number of transplanting plantlets	存活株数 Number of survival plantlets	存活率 Survival rate /%
草炭土 + 蛭石 Turfy-soil + vermiculite(V: V = 1:1)	120	93	77.5
草炭土 + 苔藓 Turfy-soil + moss(V: V = 1:1)	124	112	90.3
草炭土 + 河砂 Turfy-soil + sand(V: V = 1:1)	106	47	44.3

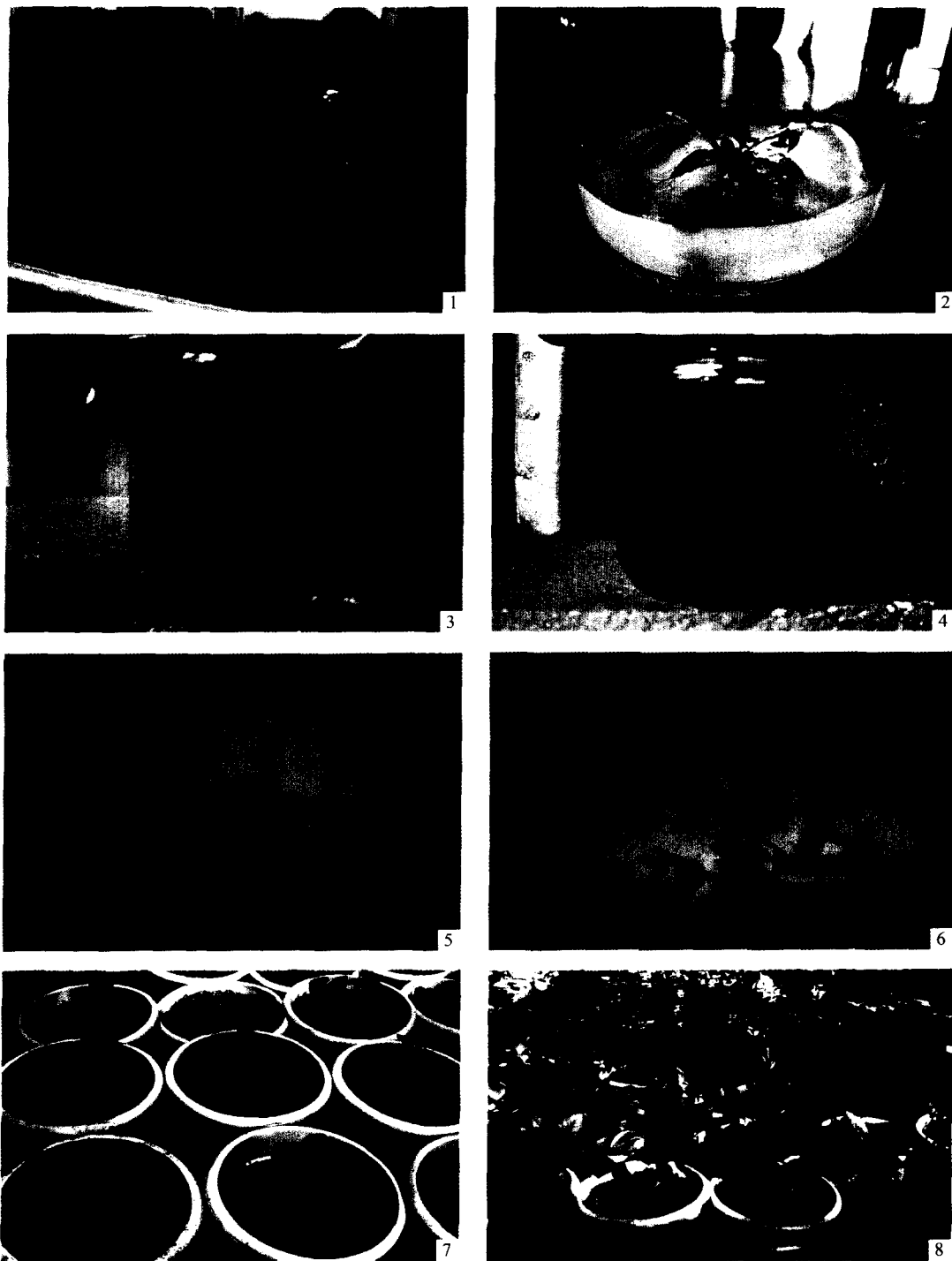
液时,以蛭石块、滤纸团、脱脂棉球吸透而没有多余液体为好。

移栽试验表明,采用草炭土+苔藓(体积比为1:1)基质,存活率高。原因主要是这种基质疏松湿润,持水能力强且通气性好,有机质含量较高。而草炭土加入河砂的处理试管苗存活率最低,说明较低的有机质含量以及较差的保水能力和理化性状不利于越桔试管苗存活、生长。

参 考 文 献

- 陈正华. 1986. 木本植物组织培养及其应用. 北京:高等教育出版社,24 - 74
- 顾 娟,贺善安. 2001. 蓝浆果与蔓越桔. 北京:中国农业出版社,1 - 24
- 刘福生,彭同江,张宝述. 2001. 膨胀蛭石的利用及其新进展. 非金属矿,24(4):5 - 7
- 刘庆忠,赵红军,郑亚芹,等. 2001. 高灌蓝莓微体繁殖技术研究初报. 落叶果树,(5):1 - 3
- 王侠礼,钟士传,郑亚芹,等. 2003. 美国高灌蓝莓的引进及微体快繁技术研究. 中国种业,(12):40 - 41
- 於 虹,王传永,吴文龙. 2003. 蓝浆果栽培与采后处理技术. 北京:金盾出版社,1 - 2
- 赵建萍,毕可华,王修强,等. 1998. 不同支持物对“艾西丝”南瓜试管苗生根影响的研究. 生物技术,8(3):27 - 29
- Dweikat M, Lyrene P M. 1998. Adventitious shoot production from leaves of blueberry cultured in vitro. Hort Science, 23: 629
- Rowland L J, Ogden E L. 1992. Use of a cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf section of high blueberry. Hort Science, 27(10): 1127 - 1129
- Wojciech L, Grzegorz S, Dorota W. 2005. Field performance of highbush blueberries (*Vaccinium × corymbosum* L.) cv. Herbert propagated by cuttings and tissue culture. Scientia Horticulturae, 106: 162 - 169
- Wolfe D E, Eck P, Hin C. 1983. Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry. HortScience, 18(6): 703 - 705

(责任编辑 徐 红)



1. '晚蓝'初代培养(30 d); 2. '蓝丰'初代培养(60 d); 3. 丛生苗('晚蓝'); 4. 有效苗分化('蓝丰'); 5. 生根苗(60 d, '晚蓝'); 6. 蛭石培养基诱导的生根苗(40 d, '晚蓝'); 7. 再生植株移栽(60 d, '晚蓝'); 8. 再生植株移栽(150 d, '蓝丰')。

1. Initial *in vitro* culture of 'Lateblue'(30 d); 2. Initial *in vitro* culture of 'Bluecrop'(60 d); 3. Clump shoots ('Lateblue'); 4. Differentiation of efficiency seedlings ('Bluecrop'); 5. Rooting seedlings(60 d, 'Lateblue'); 6. Rooting seedlings induced by vermiculite medium(40 d, 'Lateblue'); 7. Regenerated plantlets transplanted (60 d, 'Lateblue'); 8. Regenerated plantlets transplanted (150 d, 'Bluecrop').